

花粉発達を阻害するミトコンドリアタンパク質の機能解析

久保 友彦 [北海道大学大学院農学研究科/講師]

背景・目的

細胞質雄性不稔性(CMS)は花粉の形成が特異的に阻害される形質であり、一代雑種子生産において育種的利用価値が高い。現在、CMSの発現機構については、ミトコンドリアゲノム再編成の結果生じた変異遺伝子がミトコンドリア機能不全をもたらす、花粉形成阻害に至ると考えられている。しかしながら、変異遺伝子翻訳産物については解析例が乏しい。こうした背景に基づき本研究では、テンサイS-2型およびS-3型CMS原因候補遺伝子である*orf129*の翻訳産物をミトコンドリアに蓄積する形質転換タバコならびにアラビドプシスを作成し、雄性不稔性が再現されるか否かを調査した。

内容・方法

*orf129*遺伝子の発現が花粉形成に及ぼす影響を調査するため、*orf129*遺伝子のタンパク質コード域にミトコンドリア移行シグナルペプチドをコードする配列を付加して核で発現させ、翻訳産物がミトコンドリアに蓄積するような実験を設計した。移行シグナルペプチドには、ミトコンドリアへの移行能が確認されているテンサイPDHE1 α のN末端側の57アミノ酸残基もしくはテンサイALDH2のN末端側の70アミノ酸残基を用いた。プロモーターには強い恒常発現を示すE12 Ω もしくはABCモデルにおいて*whorl2*及び*whorl3*が発現が確認されているアラビドプシス*apetala3*遺伝子のプロモーターを用いた。移行シグナルとプロモーターの組み合わせを変えることにより複数種の*orf129*融合遺伝子を作成した。さらに、対照区として上述のテンサイPDHE1 α の移行シグナルと*gfp*との融合遺伝子、ならびにミトコンドリア移行シグナルを付加しない*orf129*融合遺伝子も併せて構築した。作成したコンストラクトはアグロバクテリウムを介してタバコもしくはアラビドプシスに導入した。

結果・成果

1. 形質転換タバコにおける表現型

1) 融合遺伝子EP1を導入した形質転換体

融合遺伝子の発現が認められた形質転換体においては半不稔個体が2個体(EP1-9およびEP1-10)認められ、正常花粉率はそれぞれ23%と57%であった。さらに、花粉粒の形状がいびつであり、互いに固着して団塊状態となり容易に分離しないという表現型(団子型)が1個体(EP1-3)で観察された。

次に、形質転換体のT1世代を育成し、融合遺伝子の発現と花粉稔性を調査した。その結果、ORF129タンパク質の蓄積が緑葉中で認められた23個体のうち21個体が可稔であった。団子状の花粉をつけた形質転換体EP1-3の後代においては同様の変異を持つ個体は出現しなかった。さらに稔性低下が観察された個体の中には、ウエスタン・ブロット解析で、ORF129タンパク質の蓄積が確認

されなかった個体もあった。

2) 融合遺伝子AP1を導入した形質転換体

形質転換体は4個体得られたが、そのうちの2個体が団子型であった。さらに1個体は花粉壁残渣のような構造物が葯内壁に固着しているのみで花粉がまったく存在しなかった(pollenless型)。

続いて、団子状の花粉をつけた1個体については自殖により、また花粉をつけない個体に関しては野生株との交配で得られたT1世代を育成し、導入遺伝子の発現と表現型の関連を調査した。いずれの個体の後代においても、融合遺伝子の発現が示唆された個体は全て花粉の異常が認められ、逆にORF129タンパク質の蓄積が確認されなかった個体は可稔であった。従って導入遺伝子の発現と花粉異常に相関が認められた。

2. 形質転換アラビドプシスにおける導入遺伝子の発現と表現型

1) 融合遺伝子EP1を導入した形質転換体

導入遺伝子の発現が確認された13個体中2個体(EP1-2およびEP1-3)で正常花粉率の低下が認められた。半不稔個体の正常花粉率はともに35%であった。続いて、導入遺伝子の発現と稔性の低下に関連があるかを後代検定により調査した。その結果、EP1-2のT2世代では、ORF129タンパク質の蓄積が確認された全ての個体が半不稔性を示し、導入遺伝子の発現と100%の相関が認められた。EP1-3のT2世代では完全でないものの導入遺伝子の発現と半不稔性との密接な相関が存在することが明らかになった。また、ORF129タンパク質の蓄積が見られない個体では稔性の低下は認められなかった。

2) 融合遺伝子EA1を導入した形質転換体

12個体で導入遺伝子の発現が確認された。花粉稔性について、コットンブルー染色により調査したところ、ORF129タンパク質の蓄積が確認された12個体のうち2個体(EA1-2およびEA1-3)が半不稔性を示し、1個体(EA1-1)が完全不稔性を示した。正常花粉率はEA1-2が52%、EA1-3が42%であった。花粉稔性の低下が観察された個体のT2世代を育成し、*orf129*融合遺伝子の発現と雄性不稔性の関連を調査した。結果、EA1-1とEA1-2の後代では両者に密接な相関があることが示唆された。

今後の展望

本研究において得られた形質転換体は、花粉外壁やタペト層に異常を来していた。こうした表現型はミトコンドリアに固有ポリペプチドを蓄積する多くの植物種のCMS株にも共通に観察されるので、本実験系はCMSを再現していると見て良い。ミトコンドリアへの外来タンパク質の蓄積と花粉不稔との関連は明らかではないが、これまでの研究を総合すると異常タンパク質がミトコンドリア膜に局在することが重要なのではないかと推測される。今後、得られた形質転換体を実験材料にミトコンドリア機能不全の生理学的側面や花粉形成に関与する遺伝子の発現様式を調査し、雄性不稔のメカニズムに関しても探っていく予定である。